论著

文章编号:1000-5404(2005)16-1634-03

自体血清对牛血清适应性人间充质干细胞增殖的影响

罗 飞,许建中,王序全,谢 肇,代 飞,何清义,尹芝华 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察自体血清对牛血清适应性人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)体外增殖的影响。**方法** 用10%的自体血清培养牛血清适应性hMSCs,分别以新生牛血清、胎牛血清及全程自体血清组作为对照,通过相差显微镜、细胞计数、MTT法、CCK-8(cell counting Kit-8)检测观察各组hMSCs的增殖状况。**结果** 各组细胞均呈现正常的形态,细胞生长曲线相似,自体血清促进hMSCs体外增殖的效率与胎牛血清相似,较新生牛血清高;自体血清对牛血清适应性hMSCs的增殖效率有负面影响,但仍比新生牛血清更高。**结论** 10%的自体血清对hMSCs具有与胎牛血清类似的良好促增殖作用,并对牛血清适应性hMSCs的促增殖效率有尚可接受的轻微不利影响。

关键词:间充质干细胞;组织工程;自体血清
中图法分类号:R329-33;R329.28 **文献标识码**:A

Effect of autologous serum on the proliferation of hMSCs adapted with calf serum

LUO Fei, XU Jian-zhong, WANG Xu-quan, XIE Zhao, DAI Fei, HE Qing-yi, YIN Zhi-hua (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of autologous serum (AS) on the proliferation of hMSCs adapted with the calf serum *in vitro*. **Methods** hMSCs adapted with the calf serum were cultured with the newborn calf serum (NCS), fetal calf serum (FCS) and AS. hMSCs cultured with the whole-range AS were taken as control group. The cellular proliferation of four groups were observed by phase contrast microscope, and detected with cell counting, MTT assay and CCK-8 assay. **Results** hMSCs cultured in the whole-range AS were morphologically indistinguishable from the control group. The effect of whole-range AS on hMSCs was similar to FCS, better than the whole-range NCS. The effect of AS on the proliferation of hMSCs adapted with calf serum was slightly decreased, but still better than the whole-range NCS. **Conclusion** The culture of hMSCs in 10% AS is benefitial to the proliferation as in 10% FCS, but keeps acceptable adverse effect on the proliferation of hMSCs after cultured with NCS.

Key words: mesenchymal stem cells; tissue engineering; autologous serum

组织工程医疗产品走向临床需要严格符合生物安全性要求,在制备过程中为了避免牛血清带来的异种免疫原,可能需要部分采用自体血清(autologous serum, AS)来替代牛血清。为了达到尽量减少自体血清使用量和控制产品中牛血清残留量的目的,设想在种子细胞增殖阶段使用牛血清;由于支架会吸附培养基中的血清成分,并难以分离,细胞与支架材料复合后改用AS。血清在细胞培养中发挥重要的作用,不同种类、甚至批号的血清都可能对人间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)体外扩增的数量和质量有显著的影响[1]。AS对牛血清适应性的hMSCs体外增殖的影响尚少见文献报道,本实验拟通过实验观察为探索减少组织工程骨产品中牛血清残留量的新制备策略提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨髓间充质干细胞由青年自愿捐献者穿刺抽取髂骨骨髓进行分离、培养获得。自体血清同期采取捐献者自体静脉血制得。DMEM/F12培养液(美国Hyclone公司),MTT(美国Sigma公司),二甲基亚砜(美国Sigma公司),CCK-8试剂(Cell Counting Kit-8 日本 同仁化学研究所),优等胎牛血清(Fetal Calf Serum, FCS, 美国 Gibco 公司, CAT No. 26140-079, LOT No. 1132195),新生牛血清(newborn calf serum, NCS,美国Gibco公司,CAT No. 26010-074,LOT No. 1184118),各型细胞培养板(美国NUCLON)。原代细胞培养液:DMEM/F12培养基+15%血清+青、链霉素各100 U/ml,pH 7.3。传代细胞培养液:DMEM/

基金项目:国家高技术研究发展计划资助重大攻关课题("863"计划)(2003-AA205020),重庆市科学技术重点攻关项目(2003-13-6),西南医院临床研究课题(SW2004007)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205020), the Sci & Tech Research Project of Chongqing (2003-13-6) and the Clinical Research Project Sponsored by Southwest Hospital of Third Military Medical University (SW2004007)

作者简介:罗 飞(1976-),男,四川省内江市人,博士研究生,医师,主要从事骨组织工程相关方面的研究。电话:(023)66930632,E-mail:luofly1009@hotmail.com
通讯作者:许建中,电话:(023)68754164,E-mail:xjzslw@hotmail.com

收稿日期:2005-01-30;**修回日期**:2005-06-24

F12 培养基 + 10% 血清 + 青、链霉素各 100 U/ ml,pH 7.3。

1.2　方法

1.2.1　实验分组　　A 组: 全程 AS 组;B 组: 全程 NCS 组;C 组: NCS 培养至 P2 后换用 AS 组(实验组);D 组: NCS 培养至 P2 后换用 FCS 组。

1.2.2　hMSCs 的获取和扩增　　青年健康志愿者,于髂嵴局麻后作骨髓穿刺,用已经肝素预湿的 20 ml 注射器抽取骨髓 6 ml,再抽吸等量的 DMEM/F12 培养液,混匀后缓慢沿管壁加入到含有等体积密度为 1.073 g/ml 的 Percoll 分离液离心管中,以2 000 r/min 离心 20 min,吸取中间乳白色云雾状有核细胞层,加入 D-Hanks 液 10 ml 吹打漂洗,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀加入原代培养液吹打制悬,经细胞计数后,按 $5 \times 10^5/cm^2$ 接种培养瓶,置 37 ℃,5% CO_2、饱和湿度培养箱内培养,48 h 后全量换液,以后隔日换液。待细胞融合 80 % 后进行传代培养。0.25 % 胰蛋白酶消化传代,按 $1 \times 10^4/cm^2$ 接种,换用传代细胞培养液培养。A 组的血清采用 AS,其余各组采用 NCS,取 P2 代细胞进行实验。

1.2.3　自体血清的获取　　对应的健康志愿者,无菌条件下采集静脉全血,置于含促凝剂的 50 ml 无菌离心管中,4 ℃冰箱静置 1 h, 充分凝血后予2 000 r/min 离心 20 min,转移上层的血清到新的离心管中,4 000 r/min 离心 30 min,去沉淀,0.22 μm 孔径的滤膜过滤后置 4 ℃冰箱保存。

1.2.4　细胞形态观察、计数、粘附率观察　　用 24 孔细胞培养板进行培养,每组 1 板,每孔接种20 000个 hMSCs,500 μl 培养液,A、C 组的血清采用 AS,B 组采用 NCS,C 组采用 FCS,血清含量均为 10 %,隔日换液。每 24 小时相差显微镜观察各组细胞形态,并取 3 孔细胞经 0.25 % 胰蛋白酶消化后作细胞计数。根据培养第 24 小时细胞记数结果计算各组细胞的贴附率:细胞粘附率 = (粘壁细胞数/接种细胞数) × 100%。

1.2.5　MTT 检测　　用 96 孔细胞培养板进行培养,每孔接种 4 000个细胞,100 μl 培养液,A、C 组的血清采用 AS,B 组采用 NCS,C 组采用 FCS,血清含量均为 10 %,隔日换液。于接种培养后第 1 ~ 8 天进行 MTT 检测,当日测量的每组各 5 孔分别加入 5 g/L 的 MTT 溶液 10 μl,放入培养箱继续培养 4 h,取出培养板,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入二甲基亚砜 150 μl,振荡 10 min 使沉淀充分溶解后,选择 570 nm 波长为测量波长,630 nm 为参比波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔的光吸收值(*OD*),以不加细胞的空白孔 *OD* 值作调零值,并以时间为横轴,光吸收值为纵轴绘制曲线。

1.2.6　CCK-8 检测　　细胞培养方法完全同"MTT 检测"。培养后第 1 ~ 8 天,每天在检测孔各加 CCK-8 试剂 10 μl ,继续培养 3 h 后直接测定各观测孔 *OD* 值,测定波长为 450 nm,参比波长为 655 nm,以不加细胞组为空白对照。

1.2.7　统计学处理　　实验统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 统计软件进行双因素方差分析。

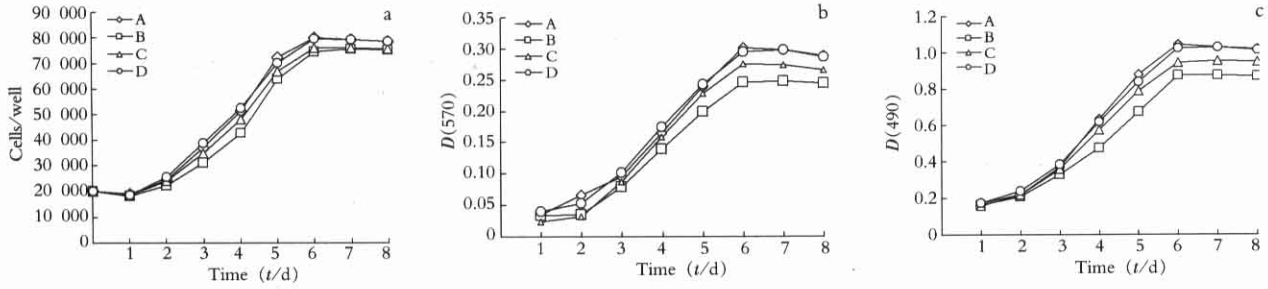
2　结果

2.1　细胞形态倒置相差显微镜观察

P2 代细胞刚传代后为为圆形,折光性好,接种 2 ~ 4 h 后细胞迅速贴壁、铺展,重新恢复为梭形,8 ~ 10 h 后活细胞基本完成贴壁,细胞均匀贴壁生长,呈长梭形,形态较单一。细胞数量逐渐增加,第 4 天约覆盖瓶底 80%,第 6 天几乎完全铺满容器底,以后部分细胞逐渐变扁,呈多角形外观,折光性减弱,胞内颗粒增加。各组细胞形态无明显差异。

2.2　细胞计数

根据各次细胞计数结果计算 24 h 贴附率,A、B、C、D 各组分别为:(94.3 ± 1.7)%、(92.3 ± 0.4)%、(93.3 ± 1.2)%、(93.0 ± 1.6)%。绘制细胞增殖曲线图 1, 两两比较 A 组与 D 组无显著差异,$P = 0.811$ ($P > 0.05$),B 组显著低于其它组($P < 0.01$),C 居中,与其它组差异显著($P < 0.01$)。



a: cell counting; b: MTT; c: CCK-8

图 1　各组细胞增殖曲线

Fig 1　Growth curves of hMSCs in the four groups

2.3　MTT 检测

根据每日检测结果绘制细胞增殖曲线见图 1。各组间差异非常显著($P < 0.01$), 两两比较 A 组与 D 组无显著差异,$P = 0.836$ ($P > 0.05$),B 组显著低于其它组($P < 0.01$),C 居中,与其它组差异显著($P < 0.01$)。

2.4　CCK-8 检测

根据每日检测结果绘制细胞增殖曲线见图 1。各组间差异非常显著($P < 0.01$), 两两比较 A 组与 D 组无显著差异,$P = 0.372$ ($P > 0.05$),B 组显著低于其它组($P < 0.01$),C 居中,与其它组差异显著($P < 0.01$)。

3　讨论

组织工程骨从种子细胞的体外扩增到组织的构建与成熟都离不开血清,不同种类甚至不同批号的血清对于 MSCs 的贴壁、扩增以及多系潜能的维持均有不同的效果[1]。目前动物实验和临床试验普遍使用的都是牛血清,而组织工程走向临床需要符合生物安全性的产品,为了避免异种血清带来的免疫原,无血清培养技术将是今后的发展方向,但是目前其促增殖效率

尚不满意,AS 代替动物血清可能是今后一段时期内的临时解决方案。

若在组织工程骨制备过程中全部使用 AS,其需求量非常大,患者难以接受。为了满足尽量少使用 AS 并尽量减少产品中动物血清的残留量,有必要对现有的制备方法进行改进。目前减少异种血清的方法主要是在组织工程骨植入体内前数小时换用无血清的培养基[2],该方法存在异种血清去除不彻底、较长时间的无血清状态可能对种子细胞的活性有不利影响等缺点。在种子细胞增殖阶段,所用的动物血清很容易通过离心洗涤的方法去除,因此可以使用动物血清;细胞与支架材料复合后,由于支架会大量吸附培养基中的血清成分,且难以再将其从支架中分离出来。因此,我们设想把细胞上架作为动物血清和 AS 的分界线,在种子细胞增殖阶段使用牛血清,细胞与支架材料复合后换用 AS。但是,经过动物血清培养的细胞再序贯应用 AS 是否会对细胞增殖有不利影响尚少有文献报道。本实验观察了 AS 对 hMSCs 体外增殖的影响为上述问题的解决提供了初步的答案。

血清在细胞培养中具有非常重要的作用,血清中除细胞生长所需的营养物质外,还提供激素和多种细胞因子,促进增殖、分化和维持表型;提供转运蛋白,供激素、矿物质、微量元素、脂质等的保存和运输;提供粘附和扩散刺激因子;提供特异性保护因子(如 α2-抗胰蛋白酶等)和提供蛋白非特异性防护酶损害,具有稳定和去毒作用。

由于供者年龄的不同,成人的血清中的细胞因子含量与常用的胎牛或新生牛不同,可能会对细胞的增殖分化有一定的影响。但是在本试验中,通过细胞计数、MTT、CCK-8 检测都证实全程使用 10% AS 与 10% 的 FCS 对 hMSCs 的促增殖作用无显著差异,均较相同浓度全程使用 NCS 组更好。McAlinden 等[3]用 AS 培养松质骨来源的细胞发现产生的细胞集落中的成纤维样细胞更加密集,5% 的 AS 组和 10% FCS 细胞增殖速度相当,10%、15%、20% AS 组较 10% FCS 组增殖速度更高。Hankey 等[4]用 10% AS 培养成骨细胞也取得比 10% FCS 更好的促增殖效果。最近,Norbert 等[5]研究发现 10% AS 对 hMSCs 的促增殖效果至少不比 10% 的 FCS 更差,与本试验的结果基本吻合,提示 AS 可能在多种细胞的体外培养中都能取得不差于 FCS 的促增殖效果。

牛血清适应性的 hMSCs 序贯使用 AS 进行培养对细胞增殖效率的影响是我们更为关注的问题。本实验表明,同样使用 NCS 培养到 P2 的细胞,再分别用相同浓度的 AS 和 FCS 进行培养,两组细胞 24 h 贴壁率相当,细胞增殖速度前者略低于后者,但较全程使用 NCS 组更高。这一现象可能与细胞培养过程中应用残留的微量牛血清成分激活了 AS 中的抗体与补体成分有关,但尚缺乏实验证明。由于种子细胞与支架材料复合后在体外的培养时间不长,通常为 3 ~ 5 d,其目的是促进种子细胞与支架材料的牢固粘附,故此方法导致种子细胞增殖活性的轻微减弱是可以被接受的。

血清对细胞分化状态也有一定影响,较低的血清浓度有益于干细胞保持未分化状态,为了兼顾细胞增殖效率和保持分化状态,目前普遍采用的血清浓度是 10% ~ 15%。血清的种类也可能影响细胞的分化状态,在本实验中各组 hMSCs 均保持了均匀一致规则的典型形态,FCS 和全程 AS 组的增殖曲线也保持了较好的吻合,提示细胞可能保持了较高未分化状态,但还有待进一步实验证实其表面标记的稳定表达和多向分化潜能维持。

CCK-8 是一种新型的活细胞计数试剂,用于细胞增殖和毒性分析。该试剂中有效成分是 WST - 8[化学名为:2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐],能被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲臜染料(formazan dye),生成的甲臜物的数量与活细胞的数量成正比。由于产物具有高度水溶性,可直接比色无需再用有机溶剂助溶,能克服在此过程中产生的操作误差[6]。因此,与 MTT 等其它四唑盐相比具有操作简便、灵敏度高、可重复性好等优点,已经开始被广泛应用[7,8]。CCK - 8 可能成为检测细胞增殖和毒性分析的经典方法,从而取代 MTT 等其它四唑盐检测法。

总之,本实验证实自体血清对 hMSCs 具有良好的促增殖作用,尤其是发现自体血清对牛血清适应性的 hMSCs 的促增殖效率不利影响较轻微,组织工程骨种子细胞上架后换用自体血清的新制备策略可以被接受。

参考文献:

[1] Lennon D P, Haynesworth S E, Young R G, *et al*. A chemically defined medium supports *in vitro* proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Exp Cell Res, 1995, 219(1): 211 - 222.

[2] 柴 岗,张 艳,刘 伟,等. 组织工程骨在颅颌面骨缺损临床修复中的应用[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(19): 1676 - 1681.

[3] McAlinden M G, Wilson D J. Comparison of cancellous bone-derived cell proliferation in autologous human and fetal bovine serum[J]. Cell Transplant, 2000, 9(4): 445 - 451.

[4] Hankey D P, McCabe R E, Doherty M J, *et al*. Enhancement of human osteoblast proliferation and phenotypic expression when cultured in human serum[J]. Acta Orthop Scand, 2001, 72 (4): 395 - 403.

[5] Stute N, Holtz K, Bubenheim M, *et al*. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use[J]. Exp Hematol, 2004, 32(12): 1212 - 1225.

[6] Kuhn D M, Balkis M, Chandra J, *et al*. Uses and limitations of the XTT assay in studies of Candida growth and metabolism[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(1): 506 - 508.

[7] Umezu Goto M, Kishi Y, Taira A, *et al*. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production[J]. J Cell Biol, 2002, 158(2): 227 - 233.

[8] Hsieh J L, Wu C L, Lee C H, *et al*. Hepatitis B virus X protein sensitizes hepatocellular carcinoma cells to cytolysis induced by E1B-deleted adenovirus through the disruption of p53 function[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 338 - 345.

(编辑 王 红)